

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO DE METALO- β -LACTAMASES PRODUZIDAS
POR AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM
DOIS HOSPITAIS DE PORTO ALEGRE**

ANDREZA FRANCISCO MARTINS

Porto Alegre, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO DE METALO- β -LACTAMASES PRODUZIDAS
POR AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM
DOIS HOSPITAIS DE PORTO ALEGRE**

Dissertação apresentada por
Andreza Francisco Martins para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Porto Alegre, 2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório da Unidade de Pesquisa Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sendo financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE).

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Dr. Afonso Luís Barth, pelas oportunidades de aprendizado que me proporcionou, por sua amizade, dedicação e exemplo de profissionalismo.

À Faculdade de Farmácia pela formação profissional e acadêmica e pela oportunidade de realizar este curso de Pós-Graduação.

Aos mestres que tanto contribuíram para minha formação, em especial a Dra. Gertrudes Corção.

A Unidade de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do HCPA, por disponibilizarem as amostras clínicas e pelo apoio dos colegas durante a realização deste trabalho.

A Unidade de Pesquisa Biomédica do HCPA, pelo auxílio na realização dos experimentos, e em especial a funcionária e amiga Patrícia Franke.

A Laborclin pelo fornecimento dos discos de papel de filtro que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas Ana Lúcia Gonçalves, Patrick Gaspareto, Larissa Lutz e Rodrigo M. Paiva pelo companheirismo, auxílio e discussões dos experimentos.

Aos meus amigos e familiares pelo incentivo e apoio para a conclusão deste trabalho.

Ao Marcelo, pelo amor, compreensão, auxílio e dedicação que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivos Gerais.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
3.2 Mecanismos de Resistência.....	7
3.2.1 Resistência aos β -Lactâmicos.....	8
3.2.2 Metallo- β -Lactamases.....	11
3.3 Tipagem Genotípica.....	15
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase.....	17
4 MATERIAS E MÉTODOS	19
4.1 Materiais e Equipamentos.....	19
4.2 Métodos.....	20
4.2.1 Identificação e coleta das amostras.....	20
4.2.2 Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana.....	21
4.2.3 Método Fenotípico para Identificação de Metallo- β -Lactamases.....	21
4.2.4 Perfil de Hidrólise.....	23

4.2.5	Tipagem Genotípica.....	24
4.2.6	Reação em Cadeia da Polimerase.....	24
4.2.7	Análise Estatística e Cálculo Amostral	26
5	RESULTADOS.....	27
5.1	Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	27
5.2	Métodos Fenotípicos para Identificação de Metallo- β -Lactamase.....	29
5.2.1	Avaliação dos Testes de Triagem.....	29
5.2.2	Testes Fenotípicos para as Amostras Clínicas.....	30
5.3	Identificação dos genes de M β la.....	33
5.4	Relação Clonal.....	34
5.5	Perfil de Hidrólise.....	37
6	DISCUSSÃO.....	40
7	CONCLUSÕES.....	50
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
AmpC	Ampicilinase
ATM	Aztreonam
<i>bla</i>_{IMP-1}	Gene de Metalo- β -lactamase IMP-1
<i>bla</i>_{SPM-1}	Gene de Metalo- β -lactamase SPM-1
<i>bla</i>_{VIM-2}	Gene de Metalo- β -lactamase VIM-2
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESBL	β -lactamase de espectro ampliado
FEP	Cefepime
GIM	<i>Germany</i> Imipenemase
GN	Gentamicina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IMP	Imipenemase
IP	Imipenem
IPI	Imipenem com EDTA
ISCMPA	Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre
Mβla	Metallo- β -lactamase
MDR	Multiple Drug-resistant
MEM	Meropenem

MLST	Multi Locus Sequence Typing
MPA	Ácido-2-mercaptopropiônico
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OXA	Oxacilinase
PB	Polimixina B
PBP	Proteínas de Ligação da Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PSE	Enzima-específica-Pseudomonas
SPM	São Paulo Metallo- β -lactamase
TE	Tetraciclina
TIM	Ticarcilina/Clavulanato
TZP	Piperacilina/Tazobactam
VIM	Verona Imipenemase

RESUMO

Introdução: *P. aeruginosa* é o principal agente causador de infecção hospitalar sendo a primeira causa de pneumonia nosocomial em hospitais brasileiros. Os carbapenêmicos são geralmente o tratamento empírico de escolha para infecções graves causadas por esta bactéria. Entretanto, seu uso tem sido limitado pelas elevadas taxas de resistência entre os isolados de *P. aeruginosa* principalmente os produtores de metalo- β -lactamases (M β la). **Objetivos:** Caracterizar e avaliar a produção de metalo- β -lactamase em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a ceftazidima e/ou imipenem em dois hospitais universitários de Porto Alegre. **Métodos:** O método de disco difusão padronizado pelo NCCLS foi utilizado para avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Um teste de aproximação de discos utilizando ceftazidima com ácido 2-mercaptopropiônico foi utilizado para triagem de amostras produtoras de M β la. A fita de Etest combinada imipenem com EDTA também foi utilizada como teste fenotípico. Os resultados destes dois testes foram comparados à PCR para pesquisa dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-2}. Os isolados produtores de M β la foram submetidos a tipagem molecular pela técnica de macrorestrição de DNA seguida de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). O perfil de hidrólise para o imipenem foi avaliado nas amostras produtoras de M β la através da variação de absorção medida a 298 nm. **Resultados:** Dos 92 isolados clínicos analisados, 33 foram positivos no teste de aproximação de discos. Destes, 18 foram produtores de SPM-1 e 5 de IMP-1. Todas as amostras produtoras de SPM-1 apresentaram razão de IP/IPI na fita combinada \geq 8. Os 18 isolados de SPM-1 foram classificados como um único padrão de PFGE que foi o predominante. Seis isolados pertenciam a um segundo padrão de PFGE, sendo que cinco destes eram IMP-1. O perfil de hidrólise mostrou que os isolados produtores de SPM-1 degradam mais efetivamente o imipenem quando comparado aos produtores de IMP-1 e aos não produtores de M β la. **Conclusões:** Há uma alta prevalência de M β la entre isolados de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem e/ou ceftazidima. O gene SPM-1 é o elemento genético mais prevalente entre as amostras de *P. aeruginosa* M β la positivas e a disseminação clonal têm contribuído para os elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos entre os isolados de *P. aeruginosa* nos hospitais deste estudo.

Palavras-Chaves: metalo- β -lactamase, carbapenêmico, PFGE

ABSTRACT

Characterization of Metallo- β -Lactamases Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in two Hospitals of Porto Alegre

Introduction: *P. aeruginosa* is a leading cause of nosocomial infection being the first cause of nosocomial pneumonia in Brazilian hospitals. The carbapenems are generally the empiric treatment of choice for serious infections caused by this microorganism. However, its use has been limited by the high rates of resistance among *P. aeruginosa*, in particular, among the isolates which bear metallo- β -lactamases (M β la). Objectives: To characterize the production of M β la in *P. aeruginosa* resistant to ceftazidime and/or imipenem in two university hospitals in Porto Alegre, RS, Brazil. Methods: The diffusion-disk method as recommended by the NCCLS was used to evaluate the *in vitro* antimicrobial susceptibility of isolates. A disc-approximation test using ceftazidime with 2-mercaptopropionic acid was used for screen isolates for M β la. Etest M β la strip was also used to as a phenotypic test. The results of these two tests were compared to a molecular methodology (PCR with specific primers to search for *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-2} genes). The M β la positive *P. aeruginosa* were typed by macrorestriction analysis followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The hydrolysis profile of imipenem was evaluated through the variation of measured absorption in 298 nm. Results: Thirty three out of 92 isolates *P. aeruginosa* proved to be M β la positive by the disc-approximation test. The SPM-1 and IMP-1 genes were found in 18 and 5, respectively, of the 33 isolates M β la positive *P. aeruginosa*. All SPM-1 producing isolates displayed a MIC rate of Imipenem/Imipenem + EDTA > 8. All 18 SPM-1 positive isolates belonged to a single clone (and its subclones) as established by macrorestriction typing. Five IMP-1 positive isolates belonged to another single. The imipenem hydrolysis profile showed that the SPM-1 producers degrade more efficiently the antibiotic when compared to the IMP-1 producers and M β la negative *P. aeruginosa*. Conclusions: There is a high rate of M β la positive *P.aeruginosa* among isolates resistant to imipenem and/or ceftazidime. The SPM-1 gene is the most prevalent genetic element found among M β la positive *P.aeruginosa* and the dissemination of single clones has contributed for the high prevalence of this resistance mechanism to carbapenems among *P. aeruginosa* in the studied hospitals.

Key Words: metallo- β -lactamase, carbapenems, PFGE

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não-fermentador muito prevalente em infecções hospitalares no mundo inteiro. Encontrada no meio ambiente, é considerada uma bactéria oportunista, sendo de alto risco para pacientes debilitados, imunodeprimidos ou em unidades de terapia intensiva (GOMES DE ARRUDA, 1998). Um estudo de vigilância antimicrobiana (SENTRY-*Antimicrobial Surveillance Program*) realizado entre 1997 e 1999, constatou que a prevalência de infecção por *P. aeruginosa* foi maior na América Latina e Ásia do que na Europa, Estados Unidos e Canadá (GALES *et al.*, 2001b). As razões para este fato não são claras e podem estar relacionadas à falhas nas práticas de controle de infecção hospitalar.

O grande problema dessas infecções tem sido a efetividade da terapia visto que a *P. aeruginosa* pode expressar diversos mecanismos de resistência. Muitos dos mecanismos de resistência estão relacionados à exposição freqüente da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos, o que é comum no ambiente hospitalar, promovendo a emergência e disseminação de resistência (NIKAIDO, 1998; TASSIOS *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2001).

Na *P. aeruginosa* a estrutura da parede celular é mais complexa, sendo o peptidoglicano recoberto por uma membrana externa lipopolissacarídica que reduz a permeabilidade dificultando a penetração de alguns antibióticos que são mais hidrofílicos, como por exemplo os β -lactâmicos (CHAMBERS & SANDE, 1996; LIVERMOORE, 1996; LISTER, 2000). Além disso, sistemas ativos de efluxo, que expulsam o antimicrobiano de dentro da célula, também conferem resistência aumentando a CIM (concentração inibitória mínima) de vários agentes como quinolonas, aminoglicosídeos, β -lactâmicos entre outros (LIVERMORE, 2001).

Outro mecanismo de resistência está relacionado à produção de β -lactamases, enzimas que clivam o anel β -lactâmico. A produção de β -lactamases

pode ser mediada por genes presentes no cromossomo ou em plasmídeo. *P. aeruginosa* pode produzir diferentes tipos de β -lactamases entre as quais se destacam AmpC (ampicilinase), PSE (enzima-específica-pseudomonas), OXA (oxacilinas) e, mais recentemente, as metalo- β -lactamases (M β la) (LIVERMORE & WOODFORD, 2000). As metalo- β -lactamases (M β la) estão classificadas na classe B de Ambler e caracterizam-se por apresentarem um perfil de hidrólise bem característico, hidrolizando todos os β -lactâmicos, exceto os monobactâmicos (LIVERMORE, 1995; PELLEGRINO *et al.*, 2002).

As metalo- β -lactamases são consideradas zinco-dependentes, pois necessitam deste metal para sua atividade. Assim, as M β la podem ser inibidas por quelantes como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que capturam o zinco do meio impedindo sua ação e, portanto, favorecendo a ação antimicrobiana. Este fato está diretamente relacionado à cinética de reação enzimática envolvida no processo, que permite diferentes níveis de inibição de acordo com as características da enzima. Isto significa que para diferentes enzimas, diferentes perfis de hidrólise dos antimicrobianos serão observados e assim, diferentes níveis de inibição podem ser produzidos (SIEMANN *et al.*, 2002).

As M β la conferem resistência à maioria dos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (sendo por isso considerada uma carbapenemase) e devido a isto, têm despertado a atenção dos microbiologistas. Este fato é especialmente importante uma vez que os carbapenêmicos representam um grande avanço para o tratamento de infecções causadas por microorganismos Gram-negativos multi-resistentes, pois possuem amplo espectro de ação (WALSH *et al.*, 2002).

As metalo- β -lactamases identificadas em *Pseudomonas aeruginosa*, até o momento, podem ser da família de genes VIM (Verona imipenemase), IMP (imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase) ou GIM (*Germany imipenemase*). A família IMP é muito comum no sul da Ásia e a família VIM tem sido relatada em isolados de *P. aeruginosa* no sul da Europa, Taiwan, Coreia e Japão (SENDA *et al.*, 1996; YAN *et al.*, 2001; BELLAIS *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2002). A família SPM foi descoberta no Brasil com relatos da presença desta enzima em São Paulo, Bahia, Brasília, Ceará e Paraná (GALES *et al.*, 2003). Além disso também foi

detectada a presença de IMP-1 e IMP-16 no Brasil (SADER *et al.*, 2005). A família GIM foi identificada na Alemanha em 2003 (CASTANHEIRA *et al.*, 2004).

A identificação de mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* no laboratório clínico é de extrema importância tanto para auxiliar no tratamento do paciente quanto para fins epidemiológicos. Um grande problema que existe é a dificuldade de detecção deste mecanismo, produção de metalo- β -lactamase, na rotina do laboratório clínico, já que o método padrão é a técnica de Amplificação do DNA com *primers* específicos utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) que é um método difícil e oneroso (ARAKAWA *et al.*, 2000).

Vários estudos têm sido realizados com o propósito de desenvolver um método prático e viável economicamente que facilite a detecção de metalo- β -lactamase na rotina laboratorial (ARAKAWA *et al.*, 2000). Entretanto, os resultados destes trabalhos são controversos, provavelmente devido à variabilidade genética destas enzimas.

Deste modo, torna-se imprescindível um estudo específico sobre as características da enzima encontrada em nosso meio, avaliando se existe relação clonal entre estes isolados, para que medidas de controle possam ser tomadas de modo a evitar a disseminação da resistência e traçar um perfil epidemiológico da sua distribuição.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar e avaliar a produção de metalo- β -lactamase em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a ceftazidima e/ou imipenem em dois hospitais universitários de Porto Alegre.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados considerados prováveis produtores de metalo- β -lactamase;
- Determinar a prevalência de metalo- β -lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (hospital 1) e na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (hospital 2);
- Comparar os resultados obtidos no teste de aproximação de discos com os resultados do teste da fita combinada para detecção de metalo- β -lactamase;
- Comparar os resultados obtidos nos testes fenotípicos para triagem de metalo- β -lactamase com o método padrão ouro (PCR);
- Avaliar o perfil de hidrólise das diferentes enzimas para o imipenem;
- Estabelecer a relação clonal entre os isolados produtores de metalo- β -lactamase.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo ubiqüitário, aeróbio estrito, não formador de esporos, móvel devido à presença de flagelo polar, que cresce em meio de agar MacConkey sendo catalase e oxidase positivos. A espécie caracteriza-se por sua incapacidade de fermentar os açúcares, embora utilize a glicose por via oxidativa. Seu requerimento nutricional é mínimo e adaptam-se a uma variedade de condições físicas sendo a temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37 °C, mas também multiplicam-se em temperaturas acima e abaixo desta faixa (MURRAY *et al.*, 1999).

As colônias de *P. aeruginosa* podem se apresentar de diferentes formas, desde colônias planas e difusas com borda irregular, característica da maioria dos isolados clínicos, até colônias bem diminutas. Um morfotipo mucóide de *Pseudomonas aeruginosa* é freqüentemente encontrado em secreções respiratórias de pacientes com fibrose cística que estão cronicamente infectados por esta bactéria. Este morfotipo ocorre devido à produção de grande quantidade de polissacarídeo, chamado alginato, que envolve a célula. O alginato protege a bactéria contra a opsonização, fagocitose, quimiotaxia e anticorpos podendo assim, estar associado ao mau prognóstico dos pacientes com fibrose cística (PITT & BARTH, 1997).

P. aeruginosa produz diversos pigmentos: piocianina (azul), pioverdina (amarelo - esverdeado) e, menos comumente, piorrubrina (vermelho) e piomelanina (marrom para o preto). A piocianina é um pigmento solúvel em água e clorofórmio e é encontrada em aproximadamente 80 % das amostras. A pioverdina é solúvel em água, mas não em clorofórmio e é encontrada em outras espécies fluorescentes de *Pseudomonas*. A piorrubrina é solúvel em água e insolúvel em clorofórmio e a piomelanina é diferente quimicamente da melanina animal. Os últimos dois

pigmentos citados são produzidos por menos de 2 % dos isolados clínicos (BARTH & PITT, 1998).

A confirmação da identificação da espécie de *P. aeruginosa* pode ser realizada pela oxidação da glicose em meio basal, produção da arginina dehidrolase, crescimento à 42 °C, redução do nitrato em nitrito e inabilidade de utilizar a maltose em meio de amônia com sais e açúcares (KONEMANN *et al.*, 1997).

Devido a sua importância como patógeno hospitalar é a espécie mais estudada dentro do gênero (MURRAY *et al.*, 1999). Sua capacidade de crescimento utilizando vários substratos como fonte de carbono facilita sua presença no meio ambiente. *P. aeruginosa* tem sido isolada de uma variedade de soluções aquosas, incluindo desinfetantes e sabões, soluções oculares e fluidos de irrigação ou diálise. A bactéria pode estar presente em líquidos sem ser detectada, já que não ocorre turvação visual em concentrações menores que 100.000 células/mL. Em hospitais, pias e canos estão quase sempre colonizados por *P. aeruginosa* (WIDMER *et al.*, 1993). A espécie também pode ser detectada em grande número de esgotos comunitários (RÖMLING *et al.*, 1994). Vários surtos de *P. aeruginosa* foram associados com sua presença em respiradores (MURRAY *et al.*, 1999).

P. aeruginosa raramente causa doenças em pessoas saudáveis. Porém, quando há alguma alteração no sistema imune do hospedeiro ou em alguma barreira física (uso de cateteres, sondas e tubo endotraqueal) as possibilidades de infecção aumentam. Além disso, fatores que envolvem a virulência e sua resistência aos antimicrobianos contribuem para seu desenvolvimento como patógeno oportunista (GALES *et al.*, 2001b). Segundo dados recentes do Programa SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program), *P. aeruginosa* é o segundo patógeno mais comumente isolado em pneumonia hospitalar, terceira causa de infecção urinária, quarta causa de infecção em feridas cirúrgicas e sétimo patógeno mais comum isolado da corrente circulatória (GALES *et al.*, 2001b).

Além dos fatores de virulência, lipopolissacarídeos, exotoxina A, leucocidina, proteases, fosfolipase e várias outras enzimas, *Pseudomonas aeruginosa* produz várias substâncias que facilitam a colonização e infecção do hospedeiro, o que a

torna a bactéria de maior significado clínico entre os bacilos Gram-negativos não-fermentadores (PITT & BARTH, 1997).

P. aeruginosa é relativamente incomum como causa de infecções adquiridas na comunidade, com notável exceção de osteomielite de pé (LAUGHLIN *et al.*, 1997) e otite externa invasiva (PITT & BARTH, 1997). Pacientes com AIDS têm sido identificados, nos últimos anos, como um novo grupo de pacientes de risco para infecções adquiridas na comunidade por *P. aeruginosa* (FLORES *et al.*, 1993; MENDELSON *et al.*, 1994).

As opções terapêuticas para tratamento das infecções por *P. aeruginosa* incluem aminoglicosídeos, fluorquinolonas, penicilinas de amplo espectro, monobactâmicos, cefalosporinas de terceira e quarta geração e carbapenêmicos (CHAMBERS & SANDE, 1996). No entanto, um dos grandes problemas no tratamento destas infecções, está relacionado ao alto nível de resistência desta bactéria aos antimicrobianos.

3.2. Mecanismos de Resistência

O grande problema das infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, como já mencionado, é a dificuldade no tratamento. As opções terapêuticas são mais restritas devido à constituição de sua parede celular e aos diversos mecanismos de resistência (BARTH & PITT, 1998). As melhores opções são ceftazidima associada a um aminoglicosídeo e/ou carbapenêmico (CHAMBERS & SANDE, 1996).

Estes mecanismos de resistência podem ser intrínsecos ou adquiridos, sendo que ambos têm sido observados para *P. aeruginosa*. Os mecanismos de resistência são provenientes da evolução da bactéria, sendo usados como proteção para o microorganismo. A resistência intrínseca é própria da bactéria e, portanto, predizível, estando relacionada com a baixa permeabilidade da membrana externa, sistema ativo de efluxo, produção de β -lactamases e de enzimas inativadoras de outros

antimicrobianos como aminoglicosídeos e quinolonas (KÖHLER *et al.*, 1999; LISTER *et al.*, 1999; LIVERMORE, 2001).

Alguns antimicrobianos hidrofílicos que possuem menor peso molecular, como o imipenem, conseguem difundir-se através de canais aquosos na membrana, formados por proteínas denominadas porinas. A ausência dessas porinas de alta permeabilidade em *Pseudomonas aeruginosa* confere resistência intrínseca a um grande número de antibióticos. Em especial pode-se citar a porina OprD, cuja ausência em algumas cepas, devido a uma mutação, dificulta a entrada do imipenem na célula. Esse fato eleva a CIM deste antimicrobiano conferindo resistência clínica de grande importância (LIVERMORE, 2001).

Outro mecanismo de resistência intrínseca importante, encontrado em *P. aeruginosa*, é o chamado sistema de efluxo. Essa bactéria contém genes estruturais de pelo menos 12 sistemas de efluxo. A ativação de um sistema eficiente, como o MexA-MexB-OprM, remove os antimicrobianos do interior da célula bacteriana, o que aumenta a CIM de penicilinas, cefalosporinas e quinolonas, sem afetar a CIM do imipenem. Apesar de não alcançar resistência clínica, a CIM do meropenem é afetada por esta bomba de efluxo (LIVERMORE, 2001).

A resistência adquirida resulta de uma alteração fisiológica ou estrutural na bactéria, não sendo predizível. Pode ou não envolver alterações genéticas. Quando há alterações genéticas, estas podem se dar por mutação, transdução, transformação ou conjugação. Quando não há alteração genética, pode ocorrer a indução de um fenótipo devido às condições do meio, que pode ser estável e permanecer mesmo quando o fator de exposição for retirado, ou instável, desaparecendo juntamente com o fator de exposição (FORBES *et al.*, 1998).

3.2.1 Resistência aos β -Lactâmicos

De um modo geral, os β -lactâmicos atuam inibindo a última etapa da síntese de peptidoglicano por inibição da transpeptidase. Além disso as Proteínas de Ligação da Penicilina (PBP) além de participarem na síntese do peptidoglicano, também participam no processo de divisão celular (CHAMBERS & SANDE, 1996).

Para ter ação antimicrobiana, os β -lactâmicos precisam penetrar na parede celular e atingir as PBP. No caso dos Gram-positivos, esse processo é facilitado pela presença das camadas de peptidoglicano que possui uma característica mais hidrofílica. Já nos Gram-negativos, como *P. aeruginosa*, esse processo torna-se mais difícil, uma vez que sua parede apresenta uma camada de lipopolissacarídeos na membrana externa que dificulta a penetração do fármaco. Além disso, *P. aeruginosa* carece das porinas de alta permeabilidade que carregam o fármaco para dentro da célula. Por isso, apenas alguns β -lactâmicos específicos apresentam atividade contra *P. aeruginosa*.

Além disso, para que tenham ação, os β -lactâmicos necessitam do anel β -lactâmico intacto. As β -lactamases rompem o anel β -lactâmico inativando o antibiótico (KOROLKOVAS, 1999). As cefalosporinas de 3^a geração apresentam maior estabilidade frente as β -lactamases, são mais ativas contra Gram-negativos e menos contra Gram-positivos, sendo que ceftazidima é a cefalosporina mais ativa contra *P. aeruginosa* e a cefepima, que é uma cefalosporina de 4^a geração, apresenta atividade comparável à da ceftazidima para *P. aeruginosa* (CHAMBERS & SANDE, 1996). Tanto ceftazidima quanto cefepima apresentam uma estrutura dipolar (*zwitterion*), isto é, íons dipolares com carga negativa no ácido carboxílico do núcleo e carga positiva no nitrogênio do anel lateral, o que contribui para uma penetração mais rápida na membrana dos Gram-negativos (KOROLKOVAS, 1999).

Os carbapenêmicos surgiram como opção terapêutica para bactérias multi-resistentes, uma vez que não são hidrolisados pela maioria das β -lactamases. Sua potente ação depende da dupla influência da tensão anelar e dos efeitos eletrônicos da ligação dupla adjacente (CHAMBERS & SANDE, 1996; KOROLKOVAS, 1999).

O aztreonam, um monobactâmico, interage com as PBP como os β -lactâmicos, mas sua atividade antimicrobiana assemelha-se a um aminoglicosídeo sendo excelente para Gram-negativos (CHAMBERS & SANDE, 1996). Juntamente com o grupo metila da posição 4, a cadeia lateral da posição 3 confere espectro antibacteriano específico e estabilidade frente à β -lactamases (KOROLKOVAS, 1999).

A produção de β -lactamases em *P. aeruginosa* ocorre freqüentemente, e estas são codificadas pelo cromossoma ou mediadas por plasmídios (ARAKAWA *et al.*, 2000). Existe mais de uma classificação para as β -lactamases. A classificação de Ambler, divide as enzimas em 4 classes (A, B, C e D) de acordo com a estrutura de cada uma (LIVERMORE, 1995). A classe A compreende as ESBLs (β -lactamases de espectro ampliado), sendo que em *P. aeruginosa* foram descritas TEM, SHV, PER-1 e VEB-1. A classe B é um grupo de β -lactamases restrito mas importante, as metalo- β -lactamases, que podem ser de origem cromossomal ou adquiridas (LIVERMORE & WOODFORD, 2000).

A classe C, inclui uma β -lactamase cromossômica induzível encontrada na maioria dos isolados de *P. aeruginosa*, a AmpC que contribui para a resistência intrínseca aos β -lactâmicos (HANCOCK, 1998; MASUDA *et al.*, 1999). O gene que codifica para esta enzima geralmente está reprimido, sendo que sua desrepressão é induzida por antibióticos, o que leva a produção reversível da enzima. Quando há produção constante é sinal que ocorreu mutação (LIVERMORE, 1995).

O gene estrutural desta β -lactamase (AmpC) em *P. aeruginosa* foi clonado e seqüenciado, mostrando ser uma típica β -lactamase da classe C. Esta enzima é induzida pelo contato da célula com baixas concentrações de β -lactâmicos, em especial o imipenem. Em *P. aeruginosa* a resistência aos β -lactâmicos é usualmente mediada pela desrepressão da β -lactamase cromossomal, que resulta em resistência a todos os β -lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos (LIVERMORE, 1995).

A classe D de β -lactamases, inclui ESBLs do tipo OXA-18, OXA-2, OXA-10 (PSE-2), OXA-21 e ARI-1. O comportamento das enzimas deste grupo é variado e são difíceis de detectar por métodos laboratoriais de rotina além de não apresentarem grande importância clínica (DANEL *et al.*, 1999).

O mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos está associado à perda de porinas. Troillet e colaboradores (1997) avaliaram os fatores de risco para o aparecimento de infecção por cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem. Eles concluíram que o uso prévio de outros β -lactâmicos não estava

relacionado ao aparecimento de resistência ao imipenem, e que as cepas resistentes ao imipenem podem permanecer sensíveis a outros β -lactâmicos. Neste estudo, somente 15 % das cepas resistentes ao imipenem eram resistentes também a ceftazidima. Essa dissociação pode ser explicada pelo fato dos carbapenêmicos utilizarem uma porina específica (porina OprD). Como os outros β -lactâmicos utilizam outras porinas, a perda da porina OprD levaria a uma resistência maior aos carbapenêmicos mesmo quando associada a hiperprodução de β -lactamases da Classe C.

3.2.2 Metallo- β - Lactamases

As β -lactamases das famílias A, C e D de Ambler usam um resíduo de serina como nucleófilo no seu mecanismo catalítico. As metallo- β -lactamases ($M\beta la$), classificadas na classe B de Ambler e na classe 3 de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH, 1998), possuem quatro características principais: (a) possuem atividade contra os carbapenêmicos; (b) não hidrolisam os monobactâmicos, como o aztreonam; (c) são inibidas por agentes quelantes, como o EDTA e ácido mercaptopropiônico e (d) requerem cátions divalentes, geralmente Zn^{+2} como cofator para sua atividade catalítica (RASMUSSEN & BUSH, 1997). Este fato está diretamente relacionado à cinética de reação enzimática envolvida no processo, que permite diferentes níveis de inibição de acordo com o tipo de enzima produzido (SIEMANN *et al.*, 2002). Além disso, as $M\beta la$ não são inibidas pelos antibióticos suicidas (tazobactam, sulbactam e ácido clavulânico) que bloqueiam a ação das serina- β -lactamases.(RASMUSSEN & BUSH, 1997).

Diversas famílias de metallo- β -lactamases foram identificadas até o momento. Bioquimicamente, essas enzimas foram divididas em três subgrupos. O primeiro deles, o subgrupo 3a inclui enzimas com amplo espectro de hidrólise para penicilinas, cefalosporinas e imipenem, hidrolisando mais rapidamente as penicilinas seguidas do imipenem. Muitas enzimas deste subgrupo necessitam de Zn^{+2} para sua atividade. O subgrupo 3b compreende as enzimas que hidrolisam carbapenêmicos preferencialmente, sendo consideradas as verdadeiras carbapenemases. Todas as enzimas deste subgrupo necessitam de Zn^{+2} para sua atividade e são inibidas por

EDTA. O subgrupo 3c compreende as enzimas que hidrolisam rapidamente ampicilina e, especialmente, cefaloridina. Este subgrupo só foi encontrado até o momento em *Legionella gormanii* (RASMUSSEN & BUSH, 1997).

As M β la são produzidas constitutivamente por algumas espécies bacterianas como: *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp e *Crhyseobacterium meningosepticum* (NORDMANN & POIREL, 2002). Entretanto, a partir da década de 90, novos genes que codificam M β la têm sido descritos mundialmente em bactérias com grande importância clínica como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* e outras bactérias da família das *Enterobacteriaceae* (POIREL *et al.*, 2000). Por estarem localizados em estruturas que conferem mobilidade aos genes, estes determinantes de resistência são conhecidos como M β la móveis ou M β la adquiridas.

A primeira M β la móvel, IMP-1 (imipenemase-1), foi caracterizada em um isolado de *Serratia marsecens* no Japão (WATANABE *et al.*, 1991). Durante muitos anos, isolados produtores de IMP-1 estavam restritos a este país mas, atualmente, amostras produtoras de IMP-1 têm sido isoladas em diversos países e em diferentes microorganismos como *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, entre outros (TYSALL *et al.*, 2002; CASTANHEIRA *et al.*, 2003). Em 1999 foi identificada a segunda M β la que foi denominada VIM-1 (Verona imipenemase-1) por ter sido isolada de uma amostra de *P. aeruginosa* em Verona, Itália (LAURETTI *et al.*, 1999). Desde então variantes de IMP e VIM têm sido relatadas em diversos países (WALSH *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 2004; TOLEMAN *et al.*, 2005).

Mais recentemente, duas novas M β la adquiridas foram descritas: SPM-1 (São Paulo Metalo- β -lactamase-1) e GIM-1 (*Germany* Imipenemase-1) que deram origem a novas famílias devido a baixa homologia que estas enzimas apresentam quando comparadas as famílias IMP e VIM (TOLEMAN *et al.*, 2002; CASTANHEIRA *et al.*, 2004). Tanto SPM-1 quanto GIM-1 foram identificadas em isolados de *P.aeruginosa* provenientes do trato respiratório.

No Brasil, já foram identificadas as famílias IMP e SPM. A família SPM foi descoberta no Brasil com relatos da presença desta enzima em São Paulo, Brasília, Ceará, Paraná e Bahia (GALES *et al.*, 2003; SADER *et al.*, 2005).

As metalo- β -lactamases têm sido freqüentemente associadas a surtos de infecção hospitalar em vários países do mundo (HIRAKATA *et al.*, 2003). Gales e colaboradores relataram em 2003 a disseminação de SPM em diferentes regiões brasileiras, devido à presença de um clone epidêmico de *Pseudomonas aeruginosa* identificado através de técnicas de tipagem molecular, PFGE (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*) e ribotipagem.

Quanto ao perfil de hidrólise para os carbapenêmicos, é difícil avaliar a habilidade da enzima em hidrolisá-los como classe. Além disso, a maior parte dos estudos é realizada com imipenem e os que possuem dados referentes ao meropenem, diferem dos resultados obtidos com imipenem (RASMUSSEN & BUSH, 1997).

Embora isolados clínicos produtores de M β la geralmente apresentem resistência ao imipenem pelo método de disco difusão, é difícil detectar a presença de M β la no laboratório já que diversos mecanismos de resistência podem estar envolvidos. Existem alguns testes já padronizados pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) que identificam mecanismos de resistência pela observação de determinados fenótipos como é o caso da pesquisa de ESBLs, MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina-resistente) e outros (NCCLS, 2004). No entanto, para metalo- β -lactamase ainda não há um método fenotípico padronizado.

Vários estudos têm sido realizados com o propósito de desenvolver um método prático e viável economicamente, que facilite a detecção de metalo- β -lactamase na rotina laboratorial. Entretanto, os resultados destes trabalhos são controversos.

Arakawa e colaboradores (2000) testaram três diferentes quelantes (ácido mercaptopropiônico [MPA], mercaptoetanol [ME] e ácido etilenodiaminotetracético [EDTA]) usando ceftazidima (CAZ) como substrato, no método de aproximação de discos, e verificaram melhores resultados com o MPA.

Outro estudo comparou dois quelantes (MPA e EDTA) com imipenem (IP) e ceftazidima no método do Etest e verificou melhores resultados com o imipenem e EDTA (WALSH *et al.*, 2002).

Um estudo testou 22 amostras produtoras de M β la e 166 não produtoras, com método de microdiluição, utilizando imipenem como substrato e EDTA como inibidor. Comparando com PCR, relataram que o teste foi capaz de identificar 95 % das amostras produtoras, com apenas 0,6 % de resultados falsos positivos. Verificaram ainda que nas amostras resistentes ao imipenem devido a outros mecanismos como deficiência de porina, AmpC ou PER-1, não houve redução da CIM do imipenem na presença de EDTA (MIGLIAVACCA *et al.*, 2002). Os autores consideraram o método de microdiluição melhor do que o disco difusão por ser facilmente padronizado e pela possibilidade de automação.

Do mesmo modo, um trabalho utilizando o método Etest também obteve bons resultados com imipenem . O estudo comparou CAZ+MPA, CAZ+EDTA, IP+MPA, IP+EDTA e obteve 100 % de sensibilidade com IP contra 54 % com CAZ quando comparados com PCR (SIEMANN *et al.*, 2002). Neste trabalho, os autores criticam Arakawa e colaboradores, dizendo que este estudo somente avaliou IMP-1 enquanto que eles avaliaram também a produção de M- β la ao nível de cromossoma.

Um estudo recente realizou um teste utilizando discos de IP+EDTA, porém o EDTA foi acrescentado no disco de IP. Avaliaram o aumento do halo para as amostras produtoras e não produtoras de M β la. Constataram que, para as produtoras, o aumento do halo foi \geq a 7 mm, mas tiveram 4 % de resultados falso-negativos e 9 % de resultados falso-positivos quando comparados com PCR (YONG *et al.*, 2002).

Assim, os resultados destes trabalhos são controversos, provavelmente devido à variabilidade genética destas enzimas. Além disso, não há muita informação sobre as características da enzima que está presente em nosso meio. Um estudo recente realizou PCR em amostras positivas para M β la no teste fenotípico, isoladas em cinco estados brasileiros diferentes, e identificaram a presença da família SPM que somente foi encontrada no Brasil até o momento (TOLEMAN *et al.*, 2002; GALES *et al.*, 2003). Deste modo, os estudos realizados com amostras das famílias IMP ou VIM podem produzir resultados diferentes aos da família SPM.

Portanto, pode-se ter a família SPM no Rio Grande do Sul, já encontrada em outras partes do país, como também pode-se ter as famílias IMP e/ou VIM. Logo, o comportamento da enzima presente em nosso meio não é conhecido, mas é de extrema importância, para que medidas preventivas contra a disseminação da resistência possam ser adotadas.

3.3 Tipagem Genotípica

Os métodos de tipagem são fundamentais para o entendimento da epidemiologia das infecções, pois estabelecem o grau de similaridade entre diferentes isolados clínicos auxiliando na detecção de surtos, na identificação de transmissão cruzada e de fontes de infecção, bem como no monitoramento e controle da infecção hospitalar (SADER *et al.*, 1993).

Microorganismos de uma mesma espécie podem apresentar alguma diversidade genotípica indicando que estes isolados não pertencem ao mesmo clone (cepa). Por outro lado, amostras clínicas de uma mesma espécie que não apresentam diversidade genotípica, constituem um mesmo clone. Assim, quando um mesmo clone é responsável por um surto, supõe-se que a infecção provém de uma mesma fonte (KONEMANN *et al.*, 1997).

Existem métodos de tipagem fenotípica e genotípica, que podem ser caracterizados conforme sua reprodutibilidade, poder discriminatório e facilidade de execução. Os métodos fenotípicos avaliam as características expressas pela bactéria, enquanto que os genotípicos baseiam-se na análise molecular. De um modo geral e especificamente para *P. aeruginosa*, os métodos fenotípicos são menos adequados na tipagem bacteriana devido a capacidade que possuem de expressar características diferentes mesmo quando trata-se de um único clone. Logo os métodos genotípicos são melhores, pois apresentam maior poder discriminatório (SPEERT *et al.*, 1994). O poder discriminatório é a capacidade do método em distinguir entre diferentes clones, sendo considerado adequado quando

a probabilidade de que duas amostras não relacionadas estejam no mesmo grupo for menor que 5 % (BLANC *et al.*, 1993).

Durante a última década, métodos tradicionais de tipagem como fagotipagem e sorotipagem foram aprimorados ou substituídos por métodos moleculares como *fingerprinting* plasmídeo, ribotipagem, métodos baseados em PCR (RFLP, RAPD, REP-PCR) e análises de padrões de restrição de DNA. A técnica de macrorestrição do DNA seguido por PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) supriu a necessidade que existia de uma técnica que pudesse ser utilizada para analisar um grande número de espécies bacterianas (TENOVER *et al.*, 1995). Atualmente técnicas de sequenciamento como *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) também tem sido utilizadas para tipagem devido a facilidade e rapidez de execução com a vantagem de poder comparar resultados obtidos em diferentes instituições e em períodos diferentes para realizar uma análise evolutiva da espécie (COOPER & FEIL, 2004).

As técnicas genotípicas mais empregadas baseiam-se na clivagem do DNA por enzimas denominadas endonucleases de restrição. Devido à alta especificidade dessas enzimas, a digestão do DNA fornece um padrão de fragmentos idêntico ou muito semelhante para todos os isolados do mesmo clone. Para *P. aeruginosa* melhores resultados foram observados com o uso das enzimas *SpeI*, *XbaI* e *DraI* (POH & YEO, 1993; GRATTARD *et al.*, 1994; GRUNDMANN *et al.*, 1995; BENNEKOV *et al.*, 1996;).

O número e o tamanho dos fragmentos de DNA gerados a partir da clivagem com endonucleases de restrição, depende do sítio de ação da enzima. Endonucleases de alta frequência produzem muitos fragmentos pequenos gerando um perfil complexo e de difícil interpretação. Já, as de baixa frequência, geram um número menor de fragmentos com alto peso molecular (10^3 pares de bases) facilitando a interpretação, mas omitindo pequenas diferenças (SADER *et al.*, 1993; SCHWARTZ & CANTOR, 1984).

Após a digestão, os fragmentos são separados por eletroforese. Fragmentos pequenos podem ser separados por eletroforese convencional, mas fragmentos de tamanho superior a 50 Kb necessitam de um campo elétrico alternado para serem separados. Na técnica que se denomina eletroforese pulsada (PFGE) os fragmentos

migram continuamente, mas sofrem reorientação na direção de migração a cada mudança no campo elétrico, o que proporciona a identificação das bandas (GRUNDMANN *et al.*, 1995). Desde que foi introduzida em 1982 por Schwartz e colaboradores, esta técnica tem sido usada para separar moléculas maiores de 12 Mb. O intervalo de tempo em que o campo elétrico se mantém numa mesma direção é denominado tempo de pulso e sua duração é o fator mais importante na determinação do tamanho molecular que é possível separar (SCHWARTZ *et al.*, 1983).

Através do perfil de macrorestrição do DNA utilizando a PFGE, é possível determinar o grau de similaridade entre os isolados de *P. aeruginosa*. A análise do padrão de bandas pode ser feita através da aquisição da imagem e posterior comparação utilizando “software” que fornece o percentual de similaridade ou através da análise visual da fotografia do gel (TENOVER *et al.*, 1995).

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase

O método de amplificação do DNA através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), consiste no desenho de iniciadores (*primers*) que são seqüências de oligonucleotídeos. Os *primers* podem ser desenvolvidos para hibridizar em regiões específicas do DNA molde, sendo então, amplificadas pela enzima *Taq* polimerase gerando um produto denominado *amplicon*. Este produto é visualizado em gel de agarose após ser submetido a eletroforese. A técnica de PCR permite a detecção de genes específicos (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{SPM-1}) responsáveis pela produção das Mβla conforme descrito em diversos estudos (SENDA *et al.*, 1996; GALES *et al.*, 2003; SADER *et al.*, 2005).

6. DISCUSSÃO

A produção de M β la tem um papel importante no perfil de susceptibilidade de amostras de *P. aeruginosa*. Um estudo do SENTRY que avaliou a evolução e o perfil de sensibilidade de *P. aeruginosa* em várias regiões entre 1997 e 1999 verificou aumento nos níveis de resistência aos carbapenêmicos no Canadá, na América Latina e na Europa. Apesar dos isolados da América Latina apresentarem menor sensibilidade a ceftazidima e cefepime, ocorreu um aumento na sensibilidade com a associação de piperacilina/tazobactam (GALES *et al.*, 2001b). Estes dados concordam com o presente trabalho que verificou sensibilidade a piperacilina/tazobactam em 3 amostras produtoras de SPM-1 que são resistentes aos demais β -lactâmicos e intermediário para o aztreonam. O mesmo estudo relatou que na América Latina foi isolado o maior número de *P. aeruginosa multiple drug-resistant* (MDR), sendo que 56 % destes, em um único hospital brasileiro. Situação similar ocorreu na Europa e na Ásia onde um hospital da Itália e um hospital da China, respectivamente, foram os responsáveis pelo maior número de isolados MDR. Estes isolados foram submetidos a tipagem molecular através de ribotipagem e PFGE constatando a disseminação clonal dentro das respectivas instituições, evidenciando que *P. aeruginosa* MDR estão diretamente relacionadas a surtos.

Neste trabalho observou-se elevado nível de resistência entre as amostras produtoras de metalo- β -lactamase. Todas as amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 são resistentes a ceftazidima e aos carbapenêmicos, restando como sensibilidade *in vitro* apenas o aztreonam e a polimixina B na maioria dos casos. Inúmeros trabalhos realizados têm demonstrado elevados níveis de resistência entre as metalo- β -lactamases. Hirikata e colaboradores (2003) relataram as características de amostras produtoras de IMP-1, constatando que mais de 75 % destes isolados eram multiresistentes apresentando resistência cruzada entre β -lactâmicos e outras classes de antimicrobianos, sugerindo a presença de outros mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* produtoras de M β la. Este fato pode estar associado ao aumento do uso de carbapenêmicos a partir da década de 90, exercendo pressão seletiva e induzindo a expressão de mecanismos de resistência.

Um estudo realizado em Nova Iorque avaliou o padrão de sensibilidade de *P. aeruginosa* em 15 hospitais diferentes. Foi observado que as amostras resistentes ao imipenem apresentavam susceptibilidade reduzida aos demais agentes antimicrobianos. Os autores demonstraram que apenas 11 % dos isolados resistentes a imipenem eram sensíveis a fluorquinolonas o que concorda com os dados apresentados por este trabalho em que 81 % das amostras resistentes a imipenem são também resistentes a ciprofloxacino comparado com 57 % de resistência para amostras sensíveis a imipenem (Tabela 4). Este fato pode estar associado a uma hiperegulação da bomba de efluxo MexEF-OprN e a diminuição da produção de OprD conferindo resistência a fluorquinolona e imipenem, que pode ter sido desencadeada pela exposição a esses agentes (BRATU *et al.*, 2005).

A detecção de metalo- β -lactamase em *P. aeruginosa* requer que o laboratório utilize técnicas especiais que ainda não estão bem estabelecidas, embora o antibiograma indique possíveis produtoras de M β la. Os testes fenotípicos de triagem baseiam-se na propriedade que as M β la possuem de serem inibidas por quelantes metálicos. O grau de inibição depende a que família a enzima pertence, do tipo de quelante usado (EDTA, MPA, mercaptoetanol e outros), do substrato (CAZ ou IP), bem como da metodologia utilizada na avaliação deste efeito inibitório.

Neste trabalho, observou-se diferença entre os resultados obtidos para os controles positivos, no teste de aproximação de discos para triagem de M β la, quando se utiliza CAZ+MPA e quando se utiliza IP+EDTA. O teste que utiliza CAZ + MPA demonstrou resultado positivo para os 3 controles usados, enquanto que o teste que utiliza IP+MPA foi inconclusivo (Tabela 5). Estudo realizado por Arakawa e colaboradores (2000) comparou a técnica de PCR (teste genotípico) para a detecção do gene responsável pela produção de M β la com o teste de aproximação de discos (fenotípico). Os autores verificaram que o teste fenotípico utilizando CAZ+MPA possui sensibilidade e especificidade comparáveis ao PCR (método padrão ouro para identificação de M β la), pois através desta técnica verificaram que bactérias resistentes a ceftazidima, produtoras de IMP-1, apresentavam aumento no halo de inibição na presença do agente quelante, enquanto que bactérias resistentes a ceftazidima, mas não produtoras de M β la, não apresentavam mudança no halo mesmo quando outros mecanismos de resistência estavam presentes .

Outro estudo realizado comparou os resultados obtidos por dois métodos fenotípicos de aproximação de discos para triagem de M β la. A comparação entre IP+EDTA e CAZ+MPA mostrou que o teste utilizando CAZ+MPA apresentou em torno de 50% de sensibilidade para identificar IMP-1 e VIM-2, enquanto que IP+EDTA não identificou IMP-1, mas apresentou melhor sensibilidade (88 %) para VIM-2 quando comparado ao teste com CAZ+MPA (EUN-JEE *et al.*, 2003).

Migliavacca e colaboradores (2002) utilizaram a técnica de microdiluição como método para detecção de M β la usando uma mistura de dois quelantes, EDTA e 1,10-fenantrolina, e o imipenem como substrato. O estudo avaliou amostras IMP-1, IMP-2, VIM-1, VIM-2, e VIM-3. Comparando com PCR, relataram que o teste foi capaz de identificar 95 % das amostras produtoras de M β la, com apenas 0,6 % de resultados falsos positivos. Este método obteve bons resultados para ambas as famílias de enzimas (IMP e VIM). Entretanto, para laboratórios que não contam com automação, este método torna-se inviável.

Assim, o presente estudo mostra que CAZ+MPA é um bom teste de triagem para detecção de SPM-1 e IMP-1, já que todas as amostras identificadas por PCR apresentaram teste positivo. O Etest[®] parece não ser muito adequado para identificação de IMP-1 mas apresenta excelente correlação com PCR para SPM-1. Este fato provavelmente deve estar relacionado a cinética enzimática. Como observado, duas amostras produtoras de IMP-1 eram sensíveis ao imipenem o que dificulta a avaliação do teste usando a fita combinada. Além disso, o número de amostras produtoras de IMP-1 neste estudo é pequeno o que também dificulta uma avaliação mais significativa destes resultados.

A fita combinada de Etest[®] identificou bem as amostras SPM-1, mas o método de triagem que utiliza o disco de imipenem com EDTA, não foi adequado. Analisando os estudos realizados, observa-se que as famílias identificadas nos mesmos, sempre foram IMP ou VIM, apenas no Brasil identificamos SPM. Até o momento, o único trabalho que utilizou imipenem com EDTA para identificação de SPM, foi o de Sader e colaboradores, 2005. Os autores utilizaram 720 μ g de EDTA e não relatam os resultados deste teste específico, apenas resultados gerais. Assim, é possível que a quantidade de EDTA que se utilizou no método de aproximação de

discos (186 µg), não seja suficiente para inibir a ação da enzima. Como se verificou nos testes de hidrólise, a família SPM demonstra uma atividade hidrolítica maior quando comparada a família IMP. Deste modo, a concentração de EDTA utilizada em outros estudos, no teste de aproximação de discos, pode não ser adequada para a família SPM e por isso os resultados teriam sido negativos.

Além disso, cabe mencionar que algumas amostras apresentaram teste de triagem positivo para produção de metalo-β-lactamase, mas não foram confirmadas por PCR para os *primers* utilizados. Recentemente foi detectada no Brasil a presença de IMP-16, em Brasília (SADER *et al.*, 2005), e assim outras sub-classes podem estar presentes em nosso meio sem ainda ter sido identificadas. Por isso é importante a investigação destas amostras utilizando *primers* degenerados para tentar identificar outras famílias ou sub-classes. Outra técnica, a focalização isoelétrica, a qual separa proteínas purificadas através de eletroforese utilizando um gradiente de pH, é muito utilizada para identificar novas β-lactamases e isolar proteínas ainda não seqüenciadas e poderia ser aplicada nestas amostras (POIREL *et al.*, 2000). De outro modo, é importante dizer que os trabalhos que realizam teste de triagem e os comparam com a PCR em geral identificam um percentual variável de resultados falso positivo (MIGLIAVACCA *et al.*, 2002; SADER *et al.*, 2005).

No presente trabalho, foram identificadas no teste de triagem, 35,9 % (25 % se considerarmos as amostras confirmadas por PCR) positivas para Mβla. Estes resultados concordam com os obtidos por Pellegrino e colaboradores (2002) que encontraram 37% de amostras positivas para Mβla. Outro estudo que avaliou a presença de um clone único de SPM-1 em cinco regiões brasileiras encontrou 35 % de amostras positivas entre as resistentes ao imipenem (GALES *et al.*, 2003).

A ocorrência de surtos relacionados a clones de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmico tem sido relatada no mundo inteiro. Neste trabalho, observou-se a relação clonal tanto entre os isolados produtores de SPM-1 quanto entre os produtores de IMP-1, identificando-os como clones únicos através da técnica de PFGE segundo os critérios de Tenover (1995). Este fato nos alerta para as questões relativas ao controle de infecção hospitalar sugerindo transmissão paciente-paciente

relacionado principalmente aos isolados SPM-1 do Hospital 2, pois este hospital foi o que mais contribuiu para estes resultados.

Pellegrino e colaboradores (2002) avaliaram a disseminação de um clone *P. aeruginosa* MDR em diferentes hospitais do Rio de Janeiro. Observaram que 37 % dos isolados resistentes a ceftazidima eram produtores de metalo- β -lactamase pelo teste de aproximação de discos. Dos 22 isolados MDR submetidos a tipagem por PFGE que pertenciam ao mesmo clone, 20 eram produtores de metalo- β -lactamase, demonstrando que o aumento das taxas de resistência no período do estudo estava diretamente relacionado à disseminação de um clone produtor de metalo- β -lactamase.

Estudos recentes têm relatado a disseminação de um clone epidêmico de SPM-1 em hospitais de diferentes regiões brasileiras. Gales e colaboradores (2003) avaliaram 43 amostras provenientes de 5 estados diferentes. Todas as 15 amostras positivas para SPM-1 identificadas pela PCR tinham o mesmo padrão de PFGE e foram associadas a altos níveis de resistência a β -lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos, como fluorquinolonas.

Estudos do SENTRY tem mostrado a disseminação e a diversidade de metalo- β -lactamases na América Latina, sendo o Brasil o país que tem apresentado maiores índices destas enzimas. De 39 amostras resistentes a ceftazidima e imipenem que foram isoladas de um mesmo hospital em São Paulo, 21 produziam SPM-1 sendo que estas estavam relacionadas ao ribogruppo predominante. Estes dados são semelhantes aos encontrados neste estudo (SADER *et al.*, 2005)

Amostras obtidas de diferentes hospitais e em um espaço de tempo considerável, apresentando essa importante relação clonal, em *P. aeruginosa* é muito raro. Estes dados sugerem que este clone se estabeleceu em nosso meio provavelmente devido as elevadas taxas de resistência que apresenta. No entanto, a mobilidade genética dos genes codificadores para M β la provavelmente é diferente entre as famílias. Assim, as metalo- β -lactamases adquiridas, IMP e VIM, estão associadas à integrons de classe 1, estruturas genéticas que propiciam a integração e excisão de genes cassetes, que em sua maioria codificam determinantes de resistência a antimicrobianos (POIREL *et al.*, 2004). Por outro lado, a família SPM-1

parece estar inserida em uma estrutura transponível única que não necessitaria da estrutura do integron para sua expressão, mas poucos estudos nesta área foram realizados. Um estudo recente seqüenciou 3,3 kb de regiões adjacentes ao *bla*_{SPM-1} e mostraram que nas amostras analisadas, este gene estaria localizado em um plasmídio de alto peso molecular e inserido numa região que contém uma *open reading frame* que codifica uma proteína homologa a outras relacionadas com multirresistência (POIREL *et al.*, 2004).

Dentre as sub-classes de metalo- β -lactamases adquiridas, descritas até o momento, SPM-1 é a mais distinta estruturalmente, apresentando apenas 30 % de homologia protéica com as demais metalo-enzimas móveis (Figura 6). A SPM-1 apresenta a inserção de 23 aminoácidos formando uma alça no sítio ativo, que é consideravelmente mais extensa do que a estrutura equivalente na IMP-1. Este fato, pode justificar as diferentes interações com substratos β -lactâmicos observadas nos estudos cinéticos com esta enzima (MURPHY *et al.*, 2003).

No presente trabalho observou-se diferença de interação com os substratos utilizados para as duas diferentes famílias encontradas que, como mencionado anteriormente, deve estar relacionado à cinética de hidrólise destas enzimas (IMP-1 e SPM-1). É importante ressaltar, por exemplo, que o perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos dos isolados produtores de IMP-1 difere em relação aos SPM-1 (Tabela 9). Entre os isolados produtores de SPM-1, nenhum apresentou sensibilidade aos carbapenêmicos.

Estes resultados concordam com Castanheira e colaboradores (2003) que observaram que os isolados produtores de IMP-1 e IMP-16 são mais sensíveis ao imipenem quando comparados aos de SPM-1.

Murphy e colaboradores (2003) observaram níveis mais elevados de hidrólise para SPM-1 quando comparados a IMP-1, VIM-1 e VIM-2. As constantes cinéticas eram maiores para SPM-1 em relação aos β -lactâmicos, com exceção do aztreonam cujo perfil de hidrólise é igual para as três famílias. Estes dados concordam com os obtidos no presente trabalho, que verificou taxas de hidrólise maiores para SPM-1 quando comparado à IMP-1. Entretanto, a avaliação do perfil de hidrólise neste

trabalho não conseguiu diferenciar entre os isolados produtores de IMP-1 e os não produtores de Mβla.

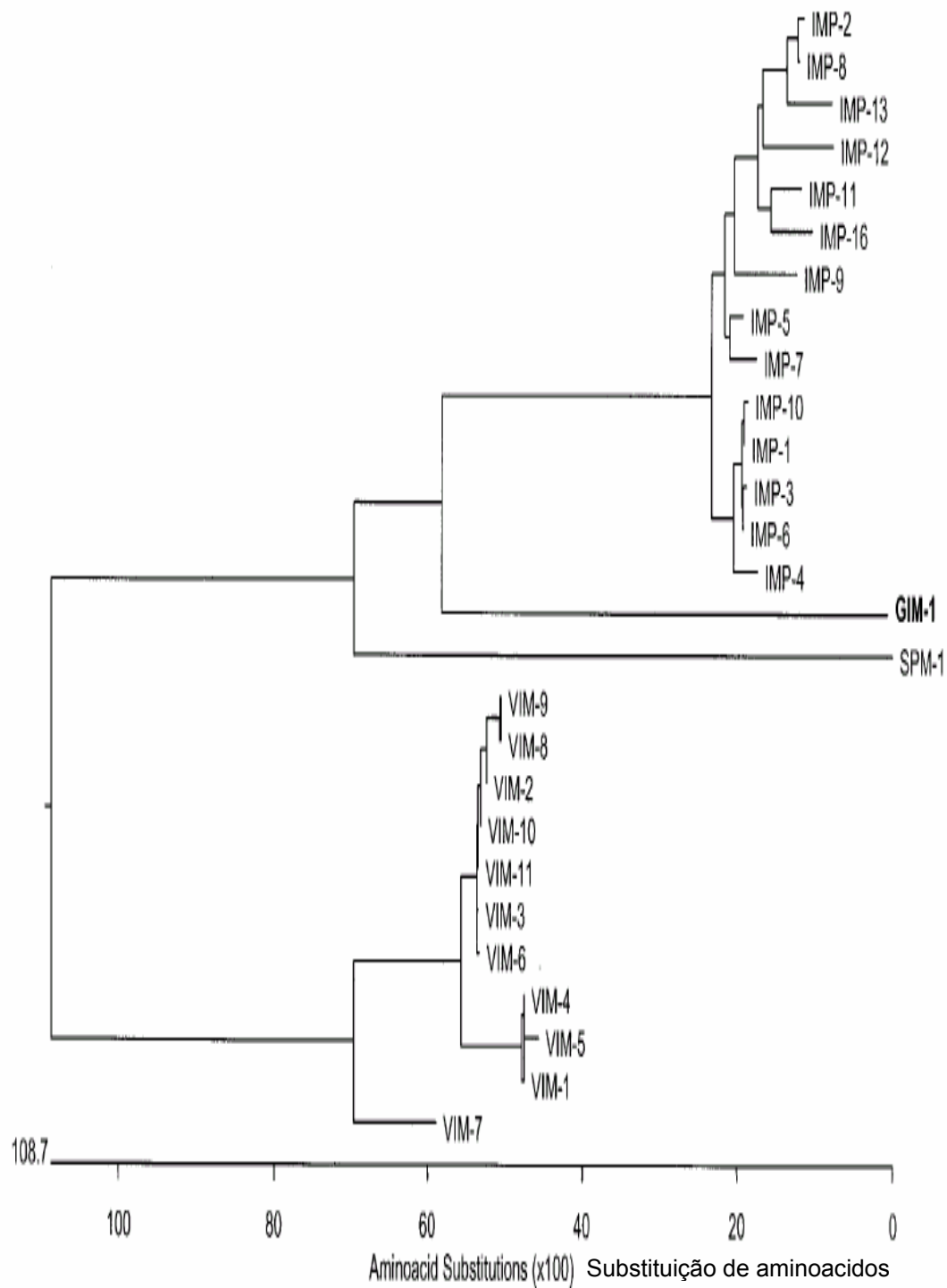


Figura 6. Dendrograma das diferentes famílias de Mβla móveis.

Esse fato deve-se provavelmente às dificuldades de padronizar a técnica de preparação do extrato enzimático a partir da célula bacteriana. O processo de ruptura da parede celular é extremamente importante para a liberação da enzima no sobrenadante e, neste estudo utilizou-se, apenas o vortex que não é o ideal. Outro fato relevante é o pequeno número de amostras IMP-1 identificadas, o que também torna a análise restrita.

Poucos estudos foram realizados até o momento utilizando esta técnica para medir a atividade hidrolítica. A maioria dos trabalhos promove uma extração prévia da enzima por colunas de sílica para depois avaliar sua capacidade hidrolítica, evitando assim a presença de interferentes (GOTO *et al.*, 2003). Logo, é necessária a realização de uma técnica quantitativa que possa identificar diferenças na atividade hidrolítica entre as amostras produtoras de M β la e as não produtoras. Neste trabalho foi detectado que realmente há diferenças e que SPM-1 apresenta uma atividade cinética diferenciada em relação as demais amostras. Estes resultados são co-substanciados pelo perfil obtido no Etest para estes isolados e no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. As amostras que apresentaram elevadas CIM e resistência aos carbapenêmicos demonstraram elevada atividade hidrolítica para o imipenem no teste de hidrólise realizado (Tabela 8).

As metalo- β -lactamases tem emergido no mundo inteiro como um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos entre bacilos gram-negativos não fermentadores (SADER *et al.*, 2005). Atualmente as informações conhecidas sobre a presença destas enzimas no Brasil estão em fase de difusão, mas somente agora foram caracterizados os isolados da região sul que até então não foram incluídos em nenhum estudo multicêntrico.

Estudos de vigilância, tem demonstrado claramente o envolvimento destes genes que codificam M β la na emergência e disseminação de resistência, representando atualmente o fator mais importante que leva ao aumento da resistência aos carbapenêmicos (SADER *et al.*, 2005). Este fato tem produzido a necessidade do uso parenteral de polimixinas e, conseqüentemente de um método que possa avaliar a resposta clínica a este fármaco. Com a introdução de aminoglicosídeos e β -lactâmicos de amplo espectro na prática clínica para tratamento de infecções causadas por Gram-negativos, o NCCLS retirou as

polimixinas de sua padronização e atualmente não há método de disco difusão padronizado. Gales e colaboradores (2001a) compararam os métodos de difusão de disco com microdiluição em caldo e determinação de CIM que é padronizado pelo NCCLS. Os pontos de corte definidos foram ≤ 10 mm para amostras resistentes e ≥ 14 mm para amostras sensíveis, mas persistiu um erro superior a 3,5 %. Assim, sugere-se que os resultados de disco difusão sejam confirmados determinando a CIM.

No presente trabalho encontrou-se uma amostra resistente a polimixina B pelo método de disco difusão (halo ≤ 10 mm). Alguns estudos têm relatado isolados resistentes à polimixina B em *P. aeruginosa*. Este fato provavelmente deve-se a uma mutação que leva a hiperprodução de uma proteína de membrana, OprH, que altera a permeabilidade da membrana externa, bloqueando a entrada do fármaco na célula (GALES *et al.*, 2001a). A susceptibilidade reduzida a polimixinas relacionada com uma resposta clínica ineficaz pode ser uma situação desastrosa pois, neste caso, não haveria fármaco para o tratamento de infecções sérias causadas por *P. aeruginosa* MDR. Observou-se ainda, que 6,5 % das amostras avaliadas apresentaram um halo entre 10-14 mm (6 amostras – quatro do Hospital 1 e duas do Hospital 2), confirmando o estudo de Gales e colaboradores (2001a) que afirma a necessidade de confirmação destes resultados determinando a CIM. Além dos mecanismos de resistência que lentamente têm sido relatados para polimixinas, as dificuldades de tratamento estão muito atreladas a sua elevada toxicidade. Em alguns casos, tratar o paciente pode implicar em aumento de morbi-mortalidade .

Diante dos resultados apresentados observa-se a grande importância da caracterização das metalo- β -lactamases produzidas por *P. aeruginosa* presentes em nosso meio. As dificuldades de tratamento das infecções causadas por essas variantes MDR e o impacto clínico e epidemiológico que as mesmas causam deve despertar as equipes de vigilância nas respectivas instituições para promover o controle da sua disseminação.

7. CONCLUSÕES

- Foram identificadas amostras de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 e IMP-1 nos dois hospitais analisados;
- Os isolados produtores de SPM-1 deste estudo, não apresentam sensibilidade aos carbapenêmicos;
- O Hospital 1 apresentou 13,6 % de amostras positivas para metalo- β -lactamase e o Hospital 2 apresentou 35,4 % de amostras positivas para metalo- β -lactamase pelo método de aproximação de discos;
- A presença de M β la provavelmente está associada a taxas de resistência mais elevadas no Hospital 2;
- O melhor teste de triagem para avaliar a produção de metalo- β -lactamase é o que utiliza CAZ + MPA aproximados 1,5 cm centro a centro;
- O teste da fita combinada de IP/IPI apresenta excelente correlação com a PCR na identificação de SPM-1, mas não é adequado para avaliar a produção de M β la em amostras sensíveis ao imipenem;
- Os isolados que foram negativos na técnica de PCR para os genes estudados devem ser submetidos a PCR com outros *primers* ou a técnicas especiais para identificação de novas β -lactamases;
- Os isolados produtores de SPM-1 apresentam uma cinética enzimática diferenciada em relação aos produtores de IMP-1, evidenciada pelas diferenças obtidas no perfil de hidrólise do imipenem;
- Os isolados produtores de SPM-1 apresentam perfis semelhantes de PFGE sendo considerados clone único;
- Os isolados produtores de IMP-1 apresentam perfis semelhantes de PFGE sendo considerados clone único.

8. REFERÊNCIAS :

ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T.; FUJIWARA, H.; GOTO, M. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. **Journal of Clinical Microbiology** , v.38, n.1, p.40-43, 2000.

BARTH, A.L.; PITT, T.L. Microbial pathogens associated with cystic fibrosis: special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.2, n.2, p. 43-61, 1998.

BELLAIS, S.; MIMOZ, O.; LÉOTARD, S.; JACOLOT, A.; PETIJEAN, O.; NORDMANN, P. Efficacy of β -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** , v.6, p.2032-2034, 2002.

BENNEKOW, T.; COLDING, H.; OJENIYI, B.; BENTZON, M.; HOIGY, N. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.202-204, 1996.

BLANC, D.S.; SIEGRIST, H.H.; SAHLI, R.; FRANCIOLI, P. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa*: discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.71-77, 1993.

BRATU, S.; QUALE, J.; CEBULAR, S.; HEDDURSHETTI, R.; LANDMAN, D. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, New York: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.24, p. 196-201, 2005.

BUSH, K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, suppl. 1, p. 48-53, 1998.

CARDOSO, O.; SOUSA, J.C.; LEITÃO, R.; PEIXE, L. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.44, p. 135, 1999.

CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; MURPHY, T.A.; TOLEMAN, M.A.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Characterization of mobile elements Carrying Metallo-beta-Lactamase (MBL) Genes, blaIMP-1, blaIMP-16, blaVIM-2 from Latin American Medical Centers: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. In: ANNUAL INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 43., 2003, local. Disponível em: <http://www.Jmilabs.com/data/posters/C2-2023.pdf>

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; SCHMIDT, F.J.; WALSH, T.R. Molecular characterization of a β -lactamase Gene, blaGIM-1, encoding a

new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4654-4661, 2004.

CHAMBERS, H.F.; SANDE, M.A. Fármacos Antimicrobianos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.). **Goodman & Gilman–As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. Cap. 43, p. 757-776.

COOPER, J.E.; FEIL, E.J. Multilocus sequence typing – what is resolved? **Trends in Microbiology**, v. 12, p.373-377, 2004.

CORNAGLIA, G.; MAZZARIOL, A.; LAURETTI, L.; ROSSOLINI, G.M.; FONTANA, R. Hospital outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable Metallo- β -lactamase. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, p.1119-1125, 2000.

DANEL, F.; HALL, L.M.C.; DUKE, B.; GUR, D.; LIVERMORE, D.M. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p.1362-1366, 1999.

EUN-JEE, O., LEE, S.; PARK, Y.J.; PARK, J.J.; PARK, K.; KIM, S.; KANG, MW.; KIM, BK. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, p. 411-418, 2003.

FLORES, G.; STAVOLA, J.J.; NOEL, G.J. Bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* in children with AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v.16, p.706-708, 1993.

FORBES, B.A.; SAHAN, D.F.; WEISSFELD, A.S. Principles of antimicrobial action and resistance: *Pseudomonas*, *Burkholderia* and similar organisms. In: BAILEY (Ed.). **Diagnostic Microbiology**. 10th ed. New York: Mosby, 1998. p. 234-272, p.448-461.

GALES, A.C.; REIS, A.O.; JONES, R.N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for Polymyxin B and Colistin: review of available Interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n. 1, p.183-190, 2001a.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; TURNIDGE, J.; RENNIE, R.; RAMPHAL. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, suppl 2, p. 145-155, 2001b.

GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial**

Chemotherapy, v.52, n. 4, p.699-702, 2003.

GOMES DE ARRUDA E.A. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.31, n.5, p.503-504, 1998.

GOTO, M.; YASUZAWA, H.; HIGASHI, T.; YAMAGUCHI, Y.; KAWANAMI, A.; MIFUNE, S.; MORI, H.; NAKAYAMA, H.; HARADA, K.; ARAKAWA, Y. Dependence of hydrolysis of beta-lactams with a zinc(II)-beta-lactamase produced from *Serratia marcescens* (IMP-1) on pH and concentration of zinc(II) ion: dissociation of Zn(II) from IMP-1 in acidic medium. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.5, p. 589-594, 2003.

GRATTARD, F.; POZZETTO, B.; ROS, A.; GAUDIN, O. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* strains by ribotyping: high discriminatory power by using a single restriction endonuclease. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 275-281, 1994.

GRUNDMANN, H.; SCHNEIDER, C.; HARTUNG, D.; DASCHNER, F.; PITT, T.L. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p.528-534, 1995.

HANCOCK REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, suppl. 1, p.93-99, 1998.

HIRIKATA, Y.; TOSHIYUKI, Y.; MICHIKO,; IZUMIKAWA, K.; MARIKO, M.; SHIHO, A.; KONDOH, A.; JUNICHI, M.; HIRAYAMA, M.; YABAGIHARA, K.; MIYAZAKI, Y.; TOMONO, K.; YAMADA, Y.; KAMIHIRA, S.; KOHNO, S. Clinical and Bacteriological Characteristics of IMP-Type Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p. 26-32, 2003.

JONES, A.M.; GOVAN, J.R.; DOHERTY, C.J.; DODD, M.E.; ISALSKA, B.J.; STANBRIDGE, T.N.; WEBB, A.K. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. **Lancet**, v.18, p. 557-558, 2001.

KÖHLER, T.; MICHEA-HAMZEHPUR, M.; EPP, S.F.; PECHERE, J.C. Carbapenem activities against *P. aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, p.424-427, 1999.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. WINN, W.C.J. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. In: W.C.J. (Ed.) **Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, 5. ed. Philadelphia: Lippincott. 1997. p. 253-272.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 17, p. 18.46-18.65.

LAURETTI, L.; RICCIO, ML.; NAZZARUIK, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1584-1590, 1999.

LAUGHLIN, T.J.; ARMSTRONG, D.G.; CAPORUSSO, J.; LAVERY, L.A. Soft tissue and bone infections from puncture wounds in children. **Western Journal of Medicine**, v. 166, p. 126-128, 1997.

LEE, K.; LIM, J..B.; YUM, J.H.; YONG, D.; CHONG, Y.; KIM, J.M. bla (VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p.1053-1058, 2002.

LISTER, P.D. Beta-lactamase inhibitor combinations with extended-spectrum penicillins: factors influencing antibacterial activity against enterobacteriaceae and *P. aeruginosa*. **Pharmacotherapy**, v. 20, p. 213-218, 2000.

LISTER, P.D.; GARDNER, V.M.; SANDERS, C.C. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC Cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of Ticarcillin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.40, p. 882-889, 1999.

LIVERMORE D.M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p.557-584, 1995.

LIVERMORE, D.M. Are all beta-lactams created equal? **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, v. 101, supp.1, p. 33-43, 1996.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Current Opinion Microbiology**, v. 3, n.5, p. 489-495, 2000.

LIVERMORE, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, p. 247-250, 2001.

LOUREIRO, M.M.; MORAES, B.A.; MENDONÇA, V.L.F.; QUADRA, M.R.R.; PINHEIRO, G.S.; ASENSI, M.D. *Pseudomonas aeruginosa*: Study of Antibiotic Resistance and Molecular Typing in Hospital Infection Cases in a Neonatal Intensive Care Unit from Rio de Janeiro City, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.3, p. 387-394, 2002.

MASUDA N, GOTOH N, ISHII C, SAKAGAWA E, OHYA S, NISHINO T. Interplay between Chromosomal β -Lactamase and the MexAB-OprM Efflux System in Intrinsic Resistance to-Lactams in *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 43, p. 400- 402, 1999.

MENDELSON, M.H.; GURTMAN, A.; SZABO, S. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p.886-895, 1994.

MENDES, R.E.; TOLEMAN, MA.; RIBEIRO, J.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Characterization of an integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, blaIMP-16, and a fused form of aminoglycoside resistant gene, *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*. Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4693-4702, 2004.

MURPHY, T.A.; SIMM, A.M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 582-587, 2003.

MIGLIAVACCA R, DOCQUIER J.D, MUGNAIOLI C, AMICOSANTE G, DATURI R, LEE K, ROSSOLINI G.M, PAGANI L. Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology** , v. 40, p. 4388-4390, 2002.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; and YOLKEN, R.H. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p.517-525.

NCCLS - **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Performance Standards for Antimicrobial disk Susceptibility Tests. NCCLS Document M100-S10. Pennsylvania, 2004.

NIKAIDO, H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, suppl. 1, p. 32-41, 1998.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negatives aerobes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 8, p.321-331, 2002.

PELLEGRINO, F.L.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.D.; MDA, G.; ARANHA NOUER, S.; PINTO DE OLIVEIRA, M.; MELLO SAMPAIO, J.L.; D'ÁVILA FREITAS, A.; FERREIRA, A.L.; AMORIM ED EDE, L.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology** , v.40, n. 7, p. 2420-2424, 2002.

PITT, T.L.; BARTH, A.L. *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important pseudomonads. In: EMMERSON, AM. (Ed) **Principles and Practice of Clinical Bacteriology**. London: Wiley & Sons, 1997. p. 493-517.

POH, C.L & YEO, C.C. Recent advances in typing *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Hospital Infection** , v. 24, p. 173-181, 1993.

POIREL, L.; NAAS, T.; NICOLAS, D.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J.D.; NORDMANN, P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 891-897, 2000.

POIREL, L.; MAGALHAES, M.; LOPES, M.; NORDMANN, P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene blaSPM-1 surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1406-1409, 2004.

RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K. Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 2, p. 223-232, 1997.

RÖMLING, U.; FIEDLER, B.; BOBHAMMER, J. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **Journal Infectious Diseases**, v. 170, p. 1616-1621, 1994.

SADER, H.S.; PIGNATARI, A.C.; LEME I.L, BURATTINI M.N, TANCRESI R, HOLLIS R.J, JONES R.N Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n.1, p. 13-8, 1993.

SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 57-61, 2005.

SCHWARTZ, D.C.; SAFFRAN, W.; WELSH, J.; HAAS, R.; GOLDENBERG, M.; CANTOR, C.R. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. **Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology**, v. 47, p. 189-195, 1983.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 5647-5664, 1984.

SENDA, K.; ARAKAWA, Y.; NKASHIMA, K.; ITO, H.; ICHIYAMA, S.; SHIMOKATA, K. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 349-353, 1996.

SIEMANN, S.; BREWER, D.; CLARKE, A.J.; DMITRIENKO, G.I.; LAJOIE, G.; VISWANATHA, T. IMP-1 metallo- β -lactamase: effect of chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 3, p.190-200, 2002.

SPEERT, D.P.; PUTTERMAN, M.; GOVAN, J.; DOHERTY, C.; HOIBY, N.; OJENIYI, B.; OGLE, J.; JOHNSON, Z.; PARANCHYCH, W.; SASTRY, P.;

PITT, T.; LAWRENCE, L. The international *Pseudomonas aeruginosa* TYPING STUDY GROUP - A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis. **Journal Infectious Diseases**, v. 169, p.134-142, 1994.

TASSIOS, P.T.; GENNIMATA, V.; MANIATIS, A.M.; FOCK, C.; LEGAKIS N.J. *Pseudomonas aeruginosa* study group. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O11. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 879-901, 1998.

TENOVER, F.; ARBEIT, R.; GOERING, R.; MICKELSEN, P.; MURRAY, B.; PERSING, D.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n.5, p. 673-679, 2002.

TOLEMAN, M.A.; BIEDENBACH, D.; BENNETT, D.M.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Italian metallo- β -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 61-70, 2005.

TROILLET, N.; SAMORE, M.H.; CARMELI, Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 1094-1098, 1997.

TYSALL, L.; STOCKDALE, M.W.; CHADWICK, P.R.; PALEPOU, M.F.; TOWNER, K.J.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 217-218, 2002.

WALSH, T.R.; BOLMSTROM, A.; QWARNSTROM, A.; GALES, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2755-2759, 2002.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; HRYNIEWCZ, W.; BENNETT, P.M.; JONES, R.N. Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 116-119, 2003.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 147-151, 1991.

WIDMER, A.F.; WENZEL, R.P.; TRILLA, A.; BALE, M.J.; JONES, R.N.; DOEBBELING, B.N. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a

surgical intensive care unit: Probable transmission via hands of a health care worker. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16, p. 372-376, 1993.

YAN, J.J.; HSUEH, P.R.; K WC LUH, K.T.; TSAI, S.H.; WU, H.M. Metallo- β -lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2224-2228, 2001.

YONG, D.; LEE, K.; YUM, J.H.; SHIN, H.B.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3798-3801, 2002.